

#2



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office euro
des brevets

REC'D 26 AUG 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page; as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02013953.1

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

BEST AVAILABLE COPY



Anmeldung Nr:
Application no.: 02013953.1
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 25.06.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

MERCK PATENT GmbH
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens Phl p 4

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C07K14/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

EPO - Munich
69

25. Juni 2002

**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

**DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des
Graspollen-Allergens Phl p 4**

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens Phl p 4

5

Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung der Gensequenz des Graspollenhauptallergens Phl p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001).

30

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur

Ausschüttung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

- 5 In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.
- 10 Im Fall vom Wiesenlieschengras (*Phleum pratense*) sind bislang Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54). Phl p 2/3 (Dolecek et al., 1993, FEBS 335 (3), 299-304), Phl p 4 (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) und Phl p 13 (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) als Hauptallergene identifiziert worden.
- 20
- 25 Das Phl p 4 ist als basisches Glykoprotein mit einer Molekularmasse zwischen 50 und 60 kDa angegeben worden (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268). Das Phl p 4-Molekül ist Trypsin-resistent (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) und 75 % der Graspollenallergiker haben IgE-Antikörper gegen dieses Molekül (Valenta et al., 1993, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294). Homologe Moleküle sind aus verwandten Grasspezies beschrieben worden (Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17). Diese homologen Moleküle der Graminaen bilden die Allergengruppe 4, deren Moleküle eine hohe
- 30
- 35

- immunologische Kreuzreaktivität untereinander sowohl mit monoklonalen Mausantikörpern als auch mit humanen IgE-Antikörpern aufweisen. Im Gegensatz zu den oben genannten Hauptallergenen von *Phleum pratense* (Phl p 1, Phl p 2/3, Phl 5a und 5b, Phl p 6 und Phl p 13) ist die
- 5 Primärstruktur des Phl p 4 noch nicht aufgeklärt. Ebenso gibt es keine vollständige Sequenz von Molekülen der Gruppe 4 aus anderen Grasspezies.
- 10 Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz war bisher nicht erfolgreich. Die Ursachen hierfür sind jedoch nicht bekannt. Fischer et al. (J. Allergy Clin. Immunol., 1996; 98: 189-198) vermuten eine N-terminale Blockierung, konnten aber ein internes Peptid nach Abbau mit Lysyl-
- 15 Endopeptidase reinigen und dessen Sequenz bestimmen: IVALPXGMLK. Dieses Peptid weist Homologien zu Peptidsequenzen in den Ragweed-Allergenen Amb a1 und Amb a2 sowie Ähnlichkeiten zu Sequenzen in Proteinen von Mais (Zm58.2), Tomate (lat 59, lat 56) und Tabak (G10) auf (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198). Für *Lolium*
- 20 *perenne* wurden für das basische Gruppe-4 Allergen Peptidfragmente mit der folgenden Sequenz beschrieben: FLEPVLGLIFPAGV und GLIEFPAGV (Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).
- 25 Von dem Gruppe-4 Allergen aus *Dactylus glomerata* sind ebenfalls Peptide durch enzymatischen Abbau gewonnen und sequenziert worden: DIYNMEPYVSK (P15), VDPTDYFGNEQ (P17),
- 30 ARTAWVDSGAQLGELSY (P20) und GVLFNIQYVNYWFAP (P22) (Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).
- Auch vom Gruppe-4 Allergen des subtropischen Bermuda-Grases (*Cynodon dactylon*) sind durch Proteolyse Peptide erhalten und
- 35 sequenziert worden:

KTVKPLYIITP (S),
KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS (V49L),
TVKPLYIITPITAAMI (T33S),
LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRL (T35L),
5 KWQTVAPALPDPNM (P2),
VTWIESVPYIPMGDK (V26L),
GTVROLLXRTSNIKAFGKY (L25L),
TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS (T22L),
10 YRDLDLGVNQVVG (P3),
SATPPTHRSGLFNI (V20L),
und AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDL (V14L) (Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

15 Diese beschriebenen Peptidsequenzen für Phl p 4 und Gruppe-4 Allergene haben jedoch bisher nicht zur Aufklärung der vollständigen Primärstruktur der Gruppe-4 Allergene geführt.

20 Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand daher in der Bereitstellung der vollständigen DNA-Sequenz des Phl p 4 sowie einer entsprechenden rekombinanten DNA, auf deren Grundlage das Phl p 4-Allergen als Protein exprimiert und einer pharmakologisch
25 bedeutsamen Verwertung als solches oder in veränderter Form zugänglich gemacht werden kann.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind außer den
30 Gruppe-4 Allergenen der anderen Grasspezies die Gruppe-13 Allergene von Interesse, da sie ein den Gruppe-4 Allergenen sehr ähnliches Molekulargewicht in der SDS-PAGE zeigen und schwer durch biochemische Techniken abzutrennen sind (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332, Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).
35 Mit Hilfe der jetzt erstmalig vorliegenden, erfindungsgemäßen Protein- und

DNA-Sequenz kann jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Gruppen 4 und 13 deutlich unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen.

5 Mit der Kenntnis der DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Allergene ist es nun möglich, diese Allergene als rekombinante Proteine herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie von allergischen Erkrankungen Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50: 384-391).

10 Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Dabei werden dem Patienten
15 natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergen-
20 extrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant
25 hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen
30 Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten.

Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante
35 Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten Th-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Nukleotidsequenz des Phl p 4 Allergens
Position 1-69 (kursiv dargestellt) wurde aus der Aminosäuresequenz des Phl p 4 N-Terminus abgeleitet. Es wurden in *E. coli* häufig vorkommende Codons verwendet. Ab Position 70 entspricht die DNA-Sequenz derjenigen, die in genomischer und cDNA identifiziert wurde. Detektierte Einzelnukleotidaustausche sind an den entsprechenden Positionen vermerkt.

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des Phl p 4 Allergens
Die Aminosäurepositionen 1-33 wurden durch N-terminale Aminosäuresequenzierung des isolierten natürlichen Phl p 4 Allergens bestimmt. Die Positionen 24-500 wurden von der in Abb. 1 dargestellten DNA-Sequenz abgeleitet. Einzelnukleotidaustausche, die zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen, sind an den entsprechenden Positionen vermerkt. Aminosäurevarianten an den Positionen 1-33 entstammen der N-terminalen Proteinsequenzierung (Tab. 1).

Abbildung 3: Interne DNA-Sequenz des Phl p 4-Gens
Mit den degenerierten Primern Nr. 30 (sense) und Nr. 37 (anti-sense), beide kursiv dargestellt, wurden mit genomischer DNA erhaltene

Amplifikate kloniert und sequenziert. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Konsensus aus 6 Klonen. Der aus dieser Sequenz kreierte spezifische sense-Primer Nr. 82 ist unterstrichen dargestellt.

5

Abbildung 4: 3'-Ende der Nukleinsäuresequenz des Phl p 4-Gens

10

In einer 3'-RACE PCR mit Phleum pratense cDNA wurden Amplifikate mit dem spezifischen sense-Primer Nr. 82 (kursiv dargestellt) sowie einem Ankerprimer gewonnen und sequenziert. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Konsensus aus 3 Sequenzierungen und umfasst das 3'-Ende des Phl p 4-Gens bis zum Stopp-Codon (doppelt unterstrichen). Die Sequenzbereiche, die zur Konstruktion der anti-sense-Primer Nr. 85 und Nr. 86 herangezogen wurden, sind unterstrichen dargestellt.

15

Abbildung 5: Lokalisierung der Phl p 4- Peptide in der deduzierten Aminosäuresequenz des Phl p 4-Allergens

20

Die aus der Aminosäuresequenzierung des gereinigten und fragmentierten Phl p 4 Allergens erhaltenen Peptide P1 - P6 lassen sich eindeutig der aus der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des Phl p 4-Gens zuordnen.

25

Beschreibung der Erfindung

30

Dementsprechend kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz in der *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von allergischen Erkrankungen, speziell der Pollinosis, vorteilhaft angewendet werden.

35

Zur Herstellung des rekombinanten Allergens wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und dieses Konstrukt in einem geeigneten Zelltyp exprimiert. Nach biochemischer Reinigung steht

dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

5 Andererseits kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten allergen- oder nukleinsäurehaltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann
10 durch gezielte Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden.
15 Schließlich wird durch die Nukleinsäure an sich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergischen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

20 Bei der Erfindung handelt es sich somit um ein rekombinantes DNA-Molekül mit der in Abbildung 1 beschriebenen Nukleotidsequenz sowie um das von dieser DNA kodierte Protein gemäß Abbildung 2, welches für Menschen als ein Allergen wirkt. Dieses erfindungsgemäße Allergen ist in
25 den Pollenkörnern von *Phleum pratense* enthalten. Die Pollenkörner der anderen Graminaen-Spezies, wie z.B. *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a. enthalten homologe Allergenmoleküle (Gruppe-4 Allergene).

30 Die Homologie dieser Moleküle ist durch ihre immunologische Kreuzreaktivität sowohl mit tierischen Antiseren als auch mit humanen IgE-Antikörpern nachgewiesen worden.

35 Bei der Ermittlung der Protein- und DNA-Sequenz des Phl p 4 wurde wie folgt vorgegangen:

Die Reinigung und Isolierung des natürlichen Allergens Phl p 4 erfolgte nach beschriebenen Methoden (Fahlbusch et al. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807, Suck et al. 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402). Die
5 Feinreinigung und die Abtrennung von Spuren des Allergens der Gruppe 13 erfolgte nach der von Suck et al. (2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) beschriebenen Methode.

Von diesem aus *Phleum pratense* isolierten Phl p 4 wurde die N-terminale Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau bestimmt. Mit unterschiedlichen
10 Chargen des Phl p 4 wurden die in Tabelle 1 aufgezeigten N-terminalen Sequenzen (P1a – f) bestimmt. Als Konsensussequenz für die ersten 15 Positionen wird folgende Sequenz angesehen: YFPP'P'AAKEDFLGXL. Die Position 14 konnte nicht bestimmt werden, wahrscheinlich ist sie mit einem
15 Cystein besetzt. Die unterschiedlichen Aminosäuren auf den Positionen 6, 7, 8 und 9 bei den unterschiedlichen Chargen weisen auf Variationen im Sinne von Isoformen hin. Die Positionen 4 und 5 sind mit Hydroxyprolin (P') besetzt, was durch eine spezifische Analytik bei den Analysen der
20 Präparate p1-a und -b eindeutig festgestellt wurde.

Durch Behandlung des SDS-denaturierten Phl p 4 mit der Endopeptidase Glu-C (Promega, Heidelberg, Germany) wurden verschiedene Peptide erhalten. Von zwei Peptiden (P2 und P3) wurden die in Tabelle 1 gezeigten
25 Aminosäuresequenzen bestimmt. Durch Spaltung mit der Endopeptidase Lys-C (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden 2 Peptide (P4 und P5) gereinigt und sequenziert (Tab. 1). Durch CNBr-Spaltung wurde ein weiteres Peptid (P6) isoliert und die Aminosäuresequenz ermittelt (Tab.1).

30 Die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Sequenz und der internen Peptide 2 und 6 wurden als Grundlage für die Konstruktion von degenerierten Primern benutzt. Mit dem Sense-Primer Nr. 30 und dem Anti-Sense-Primer Nr. 37 (Tab. 2) wurden mit genomischer DNA aus
35 *Phleum pratense* Amplifikate hergestellt. Die von diesen Amplifikaten gewonnenen Klone wurden sequenziert (Abb. 3) und zur Konstruktion des

spezifischen Sense-Primers Nr. 82 benutzt (Tab. 2). Mit einer cDNA, die aus der repräsentativen mRNA-Population aus *Phleum pratense*-Pollen hergestellt wurde, und dem erfindungsgemäßen spezifischen Sense-Primer Nr. 82 sowie dem Ankerprimer AUAP (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) wurde eine PCR unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Dieses Amplifikat von ca. 450 kb wurde sequenziert und somit die fehlende Sequenz bis zum 3'-Ende des Phl p 4-Genes identifiziert (Abb. 4). Basierend auf dieser erfindungsgemäß bestimmten C-terminalen Phl p 4-Sequenz wurden die spezifischen Anti-Sense-Primer Nr. 85 und Nr. 86 konstruiert (Tab. 2). Basierend auf der N-terminalen Aminosäuresequenz des Phl p 4-Peptids P1-a (Tab. 1) wurde der degenerierte Sense-Primer Nr. 29, abgeleitet von der DNA kodierend für die Aminosäurepositionen 24-33 (LYAKSSPAYP), konstruiert.

Mit den Primern Nr. 29 und Nr. 86 wurde mit genomischer *Phleum pratense*-DNA eine PCR durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wurde als Grundlage für eine zweite PCR (nested PCR) mit den Primern Nr. 29 und Nr. 85 eingesetzt. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGEM T-easy (Promega, Heidelberg, Deutschland) inseriert, kloniert und sequenziert. Diese Sequenz beginnt an der Position 24 vom N-Terminus gerechnet bzw. Position 70 der DNA-Sequenz (Abb. 1) und reicht bis zum Primer Nr. 85, (Position 1402 in Abb. 1) der im schon bestimmten C-terminalen Abschnitt des Phl p 4-Genes lokalisiert ist. Mit diesen Daten kann die vollständige Aminosäuresequenz des Phl p 4-Moleküles aus den durch Proteinsequenzierung bestimmten ersten 33 Aminosäurepositionen und der deduzierten Aminosäuresequenz (477 Positionen), die aus den mit den Primern Nr. 29/Nr. 85 und Nr. 82/Anker-Primer hergestellten Klonen abgeleitet werden kann, konstruiert werden. Die beiden Klone überlappen in 197 Positionen ihrer Nukleotidsequenz. Das vom Klon Nr. 29/Nr. 85 kodierte Peptid überlappt auf 10 Aminosäurepositionen mit der durch direkte Aminosäuresequenzierung bestimmten N-terminalen Sequenz

(Positionen 1-33) des Phl p 4, wobei die mit beiden Methoden bestimmten Aminosäuren übereinstimmen.

5 Die Aminosäuresequenz des Phl p 4 basierend auf den direkt bestimmten N-terminalen Aminosäuren und der deduzierten Aminosäuresequenz ist in Abbildung 2 dargestellt.

10 Mit dem spezifischen Sense-Primer Nr. 88 (Tab. 2) und dem spezifischen Anti-Sense-Primer Nr. 86 wurden sowohl mit genomischer als auch mit cDNA von *Phleum pratense* PCR-Produkte hergestellt und direkt sequenziert.

15 Hierdurch ist es möglich, PCR-Fehler auszuschliessen und genetische Variationen (single nucleotide polymorphisms) aufzudecken. Die gefundenen Einzelnukleotidaustausche sind in Abbildung 1 aufgeführt. Diejenigen Einzelnukleotidaustausche, die zu veränderten Aminosäuren führen, sind in Abbildung 2 dargestellt. Diese Aminosäurevariationen sind als Isoformen des Phl p 4-Moleküles anzusehen. Die Existenz solcher Isoformen ist aufgrund des heterogenen isoelektrischen Verhaltens des natürlichen Phl p 4 zu erwarten: Alle bisher bekannten Pollenallergene weisen solche Isoformen auf. Dass das DNA-Stück, welches mit den Primern Nr. 29 und 86 bestimmt wurde, tatsächlich für ein Protein kodiert, 20 welches mit dem natürlichen Phl p 4-Allergen identisch ist, kann unter anderem auch dadurch bewiesen werden, dass für die identifizierten internen Peptide P3, P4 und P5 (Tab. 1) des natürlichen Phl p 4 homologe Peptidsequenzen in der deduzierten Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen rekombinanten Phl p 4-Moleküls gefunden werden 30 (Abb. 5). Die beschriebene Aminosäuresequenz des Phl p 4 zeigt, dass es sich um ein basisches Molekül mit einem kalkulierten isoelektrischen Punkt von 8,99, bestehend aus 500 Aminosäuren, handelt. Die quantitative Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 3 dargestellt. Das berechnete 35 Molekulargewicht dieses rekombinanten Phl p 4 beträgt 55.762 Dalton. Diese berechnete Molekularmasse stimmt sehr gut mit der durch SDS-

PAGE bestimmten Molekularmasse des natürlichen Phl p 4, für das 55 kDa bestimmt wurden, überein (Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799 -807 und Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).

5 Auch für die Gruppe-4 Allergene verwandter Grasspezies wurden Molekularmassen zwischen 50 und 60 kDa beschrieben (Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-
10 852; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17).

Zur Herstellung des rekombinanten Phl p 4-Proteins wurde die in
15 Abbildung 1 aufgeführte Phl p 4-kodierende DNA-Sequenz in Expressionsvektoren (z.B. pProEx, pλCro, pSE 380) eingebaut. Für die aus der Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Aminosäuren wurden *E. coli* optimierte Codons verwendet.

20 Nach der Transformation in *E. coli*, der Expression und der Reinigung des rekombinanten Phl p 4 durch verschiedene Trenntechniken wurde das erhaltene Protein einem Refoldingprozess unterworfen.

Dieses so gewonnene rPhl p 4-Protein ergibt eine einzelne Bande in der
25 SDS-PAGE, die im gleichen Molekulargewichtsbereich wie das natürliche Phl p 4 wandert. Die immunologische Reaktivität des rPhl p 4 konnte durch die Reaktion mit murinen monoklonalen Antikörper, die mit natürlichem Phl p 4 induziert worden waren und mit den homologen Proteinen (Gruppe
30 4) der Graminaen kreuzreagieren, nachgewiesen werden. Das rPhl p 4 reagiert mit IgE-Antikörpern von Allergikern, die nachgewiesene IgE-Reaktivität mit natürlichem Phl p 4 haben. Diese IgE-Reaktivität und damit die Wirkung als Allergen konnte sowohl im Dot-Test, Western-Blot als auch
35 nach Adsorption des Allergens an Polystyren-Mikrotiterplatten nachgewiesen werden. Bei Reaktion des rPhl p 4 mit Basophilen von

Allergengruppe 4-reaktiven Graspollenallergikern werden diese zur verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD 203c angeregt. Diese Basophilenaktivierung durch rPhl p 4 zeigt deutlich, dass dieses Molekül auch funktionell als Allergen wirkt.

5 Damit kann dieses rPhl p 4-Allergen zur hochspezifischen Diagnostik von Gras-pollenallergikern eingesetzt werden. Diese Diagnostik kann *in vitro* durch die Detektion von spezifischen Antikörpern (IgE, IgG1 - 4, IgA) und die Reaktion mit IgE-beladenen Effektorzellen (z. B. Basophile aus dem
10 Blut) oder *in vivo* durch Hauttest-Reaktionen und Provokation am Reaktionsorgan erfolgen.

15 Die Reaktion des rPhl p 4 mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern konnte durch die allergenspezifische Stimulierung der T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokinsynthese sowohl mit T-Zellen in frisch präparierten Blutlymphozyten als auch an etablierten nPhl p 4-reaktiven T-Zell-Linien und -Klonen nachgewiesen werden.

20 Basierend auf der dargelegten DNA-Sequenz des rPhl p 4 wurden Teilsequenzen kodierend für Peptide von 50 bis 350 Aminosäuren in Expressionsvektoren kloniert. Diese Teilsequenzen decken sequentiell die vollständige Sequenz des rPhl p 4 ab, wobei Überlappungen von
25 mindestens 12 Aminosäuren vorkommen. Die exprimierten Peptide entsprechen Phl p 4-Fragmenten. Diese Phl p 4-Fragmente reagieren einzeln oder als Gemisch mit den IgE-Antikörpern von Allergikern nicht oder nur in geringem Grade, so dass sie als hypoallergen eingestuft
30 werden können. Im Gegensatz dazu ist das Gemisch dieser Fragmente in gleicher Weise wie das vollständige rekombinante oder natürliche Phl p 4 zur Stimulierung von T-Lymphozyten von Graspollenallergikern mit Phl p 4-Reaktivität fähig.

35

Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die für die Cysteine kodierenden Tripletts so verändert, dass sie für andere Aminosäuren, bevorzugt Serin, kodieren. Es wurden sowohl Varianten hergestellt, bei denen einzelne Cysteine ausgetauscht wurden, als auch solche, bei denen verschiedene Kombinationen von 2 Cysteinresten bzw. alle 5 Cysteine verändert wurden. Die exprimierten Proteine dieser Cysteinpunktmutanten weisen eine stark reduzierte bzw. fehlende Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Allergikern auf, reagieren jedoch mit den T-Lymphozyten dieser Patienten.

Solche hypoallergenischen Fragmente bzw. Punktmutanten der Cysteine können als Präparate zur Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden, da sie mit gleicher Effektivität mit den T-Zellen reagieren, jedoch aufgrund der verminderten oder ganz fehlenden IgE-Reaktivität zu geringeren IgE-vermittelten Nebenwirkungen führen.

Werden die für die hypoallergenischen Phl p 4-Varianten kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderte für Phl p 4 kodierende DNA mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist somit:

- a) ein rekombinantes DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz wie in Abbildung 1 dargestellt, welche für ein Polypeptid kodiert, das als Allergen wirkt;
- b) ein DNA-Molekül, umfassend eine Nukleotidsequenz gemäß Abbildung 1, beginnend mit der Position 70, welches für ein Polypeptid mit den Eigenschaften des Majorallergens Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert;

- c) ein DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz wie in Abbildung 1 dargestellt, die für das Majorallergen Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert;
- 5 d) ein DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die mit der in Abbildung 1 angegebenen Nukleotidsequenz beginnend bei Position 1 oder 70 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von Graminaenspezies abstammt;
- 10 e) DNA-Moleküle, entsprechend Teilsequenzen und Kombinationen von Teilsequenzen, die in der Nukleotidsequenz gemäß a) - d) enthalten sind;
- 15 f) ein DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz gemäß a) - d) enthält, die durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurden;
- g) ein DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) - f), die für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert;
- h) ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül definiert nach a) - d);
- 20 i) ein Polypeptid, das von einer Nukleinsäure gemäß a) - g) kodiert wird;
- j) ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides oder eines Fragmentes oder Derivates davon, durch Kultivierung von prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, die mit einem
- 25 Expressionsvektor gemäß h) transformiert sind, und Gewinnung des entsprechenden Proteins bzw. Polypeptides aus der Kultur;
- k) eine pharmazeutische Zubereitung, die ein Polypeptid, Fragment oder Derivat nach i) oder j) enthält, zur therapeutischen Behandlung oder Diagnostik von pollenallergischen Menschen oder Tieren;
- 30 l) eine Methode zur Diagnose von Pollenallergien *in vivo* oder *in vitro* unter Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung gemäß k);
- m) eine Methode zur Therapie von pollenallergischen Menschen oder Tieren unter Verwendung der in k) definierten pharmazeutischen
- 35 Zubereitung;

- n) eine pharmazeutische Zubereitung, die einen Expressionsvektor gemäß h) enthält, zur therapeutischen Behandlung von pollenallergischen Menschen oder Tieren durch DNA-Vakzinierung;
- 5 o) eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-Vakzinierung mit der in n) definierten pharmazeutischen Zubereitung;
- p) eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-Vakzinierung mit der in n) definierten pharmazeutischen Zubereitung, wobei das in dem Expressionsvektor enthaltene DNA-Molekül immunstimulatorische
- 10 Abschnitte enthält;

Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthalten als Wirkstoffe ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen

15 Expressionsvektor und/oder deren jeweilige pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen. Hierbei können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren

20 Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

Diese Zubereitungen können als Therapeutika oder Diagnostika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe

25 kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und die Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs nicht negativ beeinflussen. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige

30 Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet

werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten. Weiterhin können durch entsprechende Formulierung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs Depotpräparate erhalten werden.

- Die Erfindung dient somit zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur spezifischen Immuntherapie von Gräserpollenallergien.

Tabelle 1 Aminosäuresequenz von Phl p 4-Peptiden

Präparat	Peptid Charge	Aminosäuren						
		1	6	11	16	21	26	31
Intaktes Phl p 4	P1-a	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKEIP	PRLLY	AKSSP	AYP
	P1-b	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKE-P	PRLLY	AKSSP	
	P1-c	YFPXX	AAKED	FLGXL				
	P1-d	YFPXX	AKKED	FLGXL				
	P1-e	YFPXX	AAKDD	FLGXL				
	P1-f	YFPXX	LANED	F				
Glu-C-Fragmente	P2	SATPF	XHRKG	VLFNI	QYV			
	P3	GLXYR	XLXPE					
Lys-C-Fragmente	P4	KXMGD	DHFXA	VR				
	P5	APEGA	VDI	I				
CNBr-Fragment	P6	MEPYV	SINPV	QAYAN	Y			

Tabelle 2 Degenerierte und spezifische Sense- und Anti-Sense-Primer, die auf der Grundlage von Phl p 4 Peptidsequenzen und DNA-Sequenzen konstruiert wurden

Primer Nr.	Peptid/DNA	Sense/Anti-Sense	Nukleotidsequenz
29	Phl p 4-P1	s	YTI TAY GCI AAR WSI WSI CCI GCI TAY CC
30	Phl p 4-P2	s	CAY MGI AAR GGI GTI YTI TTY AAY ATM C
37	Phl p 4-P6	as	TAR TTI GCR TAI GCY TGI ACI GGR TT
82	Phl p 4-DNA-NYW	s	ACT ACT GGT TCG CCC CGG GAG CC
85	Phl p 4-DNA-GLV	as	TGA AGT ATT TCT GGC CCC ACA CCA AAC C
86	Phl p 4-DNA-QRL	as	CCC TTG GTG ATG GCG AGC CTC TGG
88	Phl p 4-DNA-PSV	s	CTC AGT CCT GGG GCA GAC CAT CC

Tabelle 3 Aminosäurezusammensetzung des Phl p 4

Aminosäuren	Anzahl	Gewichts-%
Geladene	138	33,89
Säure	45	9,82
Basische	54	13,67
Polare	119	24,77
Hydrophobe	180	35,65
A Ala	40	5,10
C Cys	5	0,92
D Asp	24	4,95
E Glu	21	4,86
F Phe	24	6,33
G Gly	43	4,40
H His	10	2,46
I Ile	29	5,89
K Lys	29	6,67
L Leu	33	6,70
M Met	11	2,59
N Asn	23	4,71
P Pro*	38	6,62
Q Gln	15	3,45
R Arg	25	7,00
S Ser	30	4,68
T Thr	22	3,99
V Val	41	7,29
W Trp	13	4,34
Y Tyr	24	7,02

* einschließlich Hydroxyprolin

Patentansprüche

- 5 1) Ein rekombinantes DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz wie in Abbildung 1 dargestellt, welche für ein Polypeptid kodiert, das als Allergen wirkt.
- 10 2) Ein DNA-Molekül nach Anspruch 1, umfassend eine Nukleotidsequenz gemäß Abbildung 1 beginnend mit der Position 70, welches für ein Polypeptid mit den Eigenschaften des Majorallergens Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.
- 15 3) Ein DNA-Molekül nach Anspruch 1 entsprechend einer Nukleotidsequenz, die für das Majorallergen Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.
- 20 4) Ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von Graminaenspezies abstammt.
- 25 5) Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Teilsequenz oder einer Kombination von Teilsequenzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.
- 30 6) Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, welche durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurde.
- 35

- 7) Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, welche für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment kodiert.
- 5 8) Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.
- 10 9) Ein Polypeptid, das von einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 kodiert wird.
- 15 10) Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides oder eines Fragmentes oder Derivates davon, durch Kultivierung von prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, die zuvor mit einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 8 transformiert wurden, und Gewinnung des entsprechenden Polypeptides aus der Kultur.
- 20 11) Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend ein Polypeptid, Fragment oder Derivat gemäß Anspruch 9 oder 10 und/oder seine pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe, zur therapeutischen Behandlung von pollenallergischen Menschen oder Tieren oder zur Diagnose dieser Pollenallergien.
- 25 12) Eine Methode zur Diagnose von Pollenallergien *in vivo* oder *in vitro* unter Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung gemäß Anspruch 11.
- 30
- 35

13) Eine Methode zur Therapie von pollenallergischen Menschen oder Tieren unter Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung gemäß Anspruch 11.

5 14) Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 8 und/oder seine pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen, sowie
10 gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe, zur therapeutischen Behandlung von pollenallergischen Menschen oder Tieren durch DNA-Vakzinierung.

15 15) Eine Methode zur Therapie von Pollenallergien durch DNA-Vakzinierung unter Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung gemäß Anspruch 14.

20 16) Eine Methode gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das in dem Expressionsvektor enthaltene DNA-Molekül immunstimulatorische Abschnitte enthält.

25

30

35

25. Juni 2002

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung der Gensequenz des Graspollenhauptallergens Phl p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die

10 abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt

15 werden.

20

25

30

35

Abb. 1 Die Nukleotidsequenz des Phl p 4 Allergens

```
1  T A C T T C C C G C C G C C G G C T G C T A A A G A A G A C T T C C T G G G T T G C C T G G T T A A
1  . . . . .
51  A G A A A T C C C G C C G C G T C T G T T G T A C G C G A A A T C G T C G C C G G C G T A T C C C T
51  . . . . . A . . . . .
101 C A G T C C T G G G G C A G A C C A T C C G G A A C T C G C G G T G G T C G T C G C C G G A C A A C
101 . . . . . A . . . . .
151 G T G A A G C C G A T C T A C A T C G T C A C C C C A C C A A C G C C T C C C A C A T C C A G T C
151 . . . . . A C . . . . . A . . . . .
201 C G C C G T G G T G T G C G G C C G C C G G C A C G G T G T C C G C A T C C G C G T G C G C A G C G
201 . . . . . C . . . . . A C C . . . . .
251 G C G G G C A C G A C T A C G A G G G C C T C T C G T A C C G G T C C C T G C A G C C C G A G G A G
251 . . . . . T T . . . . . A C . . . . .
301 T T C G C C G T C G T C G A C C T T A G C A A G A T G C G G G C C G T G T G G G T G G A C G G G A A
301 . . T . . . . G . . . . C . A . . . . G . . . . .
351 G G C C C G C A C G G C G T G G G T C G A C T C C G G C G C G C A G C T C G G C G A G C T C T A C T
351 . . . . . G . . . . .
401 A C G C C A T C C A C A A G G C G A G T A C A G T G C T G G C G T T C C C G G C C G G C G T G T G C
401 . . . . . T . T . . . . . C C . C . C . . . . .
451 C C G A C C A T C G G C G T G G G C G G C A A C T T C G C G G G C G G C G G C T T C G G C A T G C T
451 . . . . .
501 G C T G C G C A A G T A C G G C A T C G C G G C C G A G A A C G T C A T C G A C G T G A A G C T C G
501 . . . . . C . G . . . . .
551 T C G A C G C C A A C G G C A C G C T G C A C G A C A A G A A G T C C A T G G G C G A C G A C C A T
551 . . . . .
601 T T C T G G G C C G T C A G G G G C G G C G G G G C G A G A G C T T C G G C A T C G T G G T C G C
601 . . . . . T . . . . .
651 G T G G A A G G T G A G G C T C C T G C C G G T G C C G C C A C G G T G A C C G T G T T C A A G A
651 . . . . . A . . . . . A . . . . . C . . . . . A A . A . . . . .
701 T C C C C A A G A A G G C G A G C G A G G G C G C C G T G G A C A T C A T C A A C A G G T G G C A G
701 . . A . . . . C A . . . . .
751 G T G G T C G C G C C G C A G C T C C C C G A C G A C C T C A T G A T C C G C G T C A T C G C G C A
751 . . . . . T . . . . . C . . . . .
801 G G G C C C C A C G G C C A C G T T C G A G G C C A T G T A C C T G G G C A C C T G C C A A A C C C
801 A . . G . . . . . C . . . . .
851 T G A C G C C G A T G A T G A G C A G C A A G T T C C C G G A G C T C G G C A T G A A C G C C T C G
851 . . . . . G . . . . . C . . . . .
901 C A C T G C A A C G A G A T G T C G T G G A T C C A G T C C A T C C C C T T C G T C C A C C T C G G
901 . . . . . A . . . . .
951 C C A C A G G G A C A A C A T C G A G G A C G A C C T C C T C A A C C G G A A C A A C A C C T T C A
951 . . . . . T . . . . .
1001 A G C C C T T C G C C G A A T A C A A G T C G G A C T A C G T C T A C G A G C C G T T C C C A A G
1001 . . . . . A . . . . .
1051 A G G G T G T G G G A G C A G A T C T T C A G C A C C T G G C T C C T G A A G C C C G G C G C G G G
1051 G A A . . . . . T . . . . . C . . . . .
1101 G A T C A T G A T C T T C G A C C C C T A C G G C G C C A C C A T C A G C G C C A C C C G G A G T
1101 . . . . .
1151 G G G C G A C G C C G T T C C C T C A C C G C A A G G G C G T C C T C T T C A A C A T C C A G T A C
1151 . . . . . G . . . . .
1201 G T C A A C T A C T G G T T C G C C C G G G A G C C G G C G C G G C G C C A T T G T C G T G G A G
1201 . . . . .
1251 C A A G G A G A T C T A C A A C T A C A T G G A G C C A T A C G T G A G C A A G A A C C C C A G G C
1251 . . . . . C . . . . .
1301 A G G C C T A C G C C A A C T A C A G G G A C A T C G A C C T C G G G A G G A A C G A G G T G G T G
1301 . . . . .
1351 A A C G A C G T C T C C A C C T T C A G C A G C G G T T T G G T G T G G G G C C A G A A A T A C T T
1351 . . . . . C . . . . .
```

1401 CAAGGGCAATTTCTAGGCTCOC CATCACCAAGGGCA TGGATCCCA
1401C.....G.....A..T.....C.....T.
1451 CCGACTACTTCAGGAACGAGCAGAGCATCCCGCCGCTCATCAAAAAGTAC
1451A.....C.....
1501 TGA
1501 ...

Abb. 2 Aminosäuresequenz des Phl p 4 Allergens

```

1 YFPFPAAKEDFLGCLVKEIPPRLLYAKSSPAYPSVLGQTI
1 .....LKND.....-.....T.....

41 RNSRWSSPDNVKPIYIVTPTNASHIQSAVVCGRRHGVRI
41 .....L..I.....T.....

81 VRSGGHDYEGLSYRSLQPPEFAVVDLSKMRVWVDGKART
81 .....T.....N.....

121 AWVDSGAQLGELYAIAHKASTVLAFPAAGVCPTIGVGGNFA
121 .....Y...FA.....

161 GGGFGMLLRKYGIAAENVIDVKLVDA NGTLHDKKSMGDDH
161 .....

201 FWAVRGGGGESFGIVVAWKVRLLPVPPTVTVFKIPKKASE
201 .....K.....I...T.T...

241 GAVDIINRWQVVAPQLPDDLMI RVI AQGP TATFEAMYLGT
241 .....K.....

281 CQTLTPMMSSSKFPPELGMNASHCNE MSWIQSIPFVHLGHRD
281 .....G.....

321 NIEDDLLNRNNTFKPFAEYKSDYVYE PFPKR VWEQIFSTW
321 .....S.....E.....

361 LLKPGAGIMIFDPYGATISATPEWATPFP HRKGVLFNIQY
361 .....S.....

401 VNYWFAPGAGAAPLSWSKEIYN YMEPYVSKNPRQAYANYR
401 .....

441 DIDLGRNEVVNDVSTFSSGLVWGQKYFKGNFQRLAITKGK
441 .....E.....

481 VDPTDYFRNEQSIPPLIKKY.
481 .....Q....

```

Abb. 3 Interne DNA-Sequenz des Phl p 4-Gens

C A C C G G A A G G G G G T G C T G T T C A A C A T C C A G T A C G T C A A
C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C G C C A T T G T
C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C T A C A T G G A G C C G T A C
G T G A G C A A G G A C C C C G T C C A G G C C T A C G C C A A C T A

Abb. 4 3'-Ende der Nukleinsäuresequenz des Phl p -gens

A C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C
G C C A T T G T C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C
T A C A T G G A G C C A T A C G T G A G C A A G A A C C C C A
G G C A G G C C T A C G C C A A C T A C A G G G A C A T C G A
C C T C G G G A G G A A C G A G G T G G T G A A C G A C G T C
T C C A C C T T C A G C A G C G G T T T G G T G T G G G G C C
A G A A A T A C T T C A A G G G C A A C T T C C A G A G G C T
C G C C A T C A C C A A G G G C A A G G T G G A T C C C A C C
G A C T A C T T C A G G A A C G A G C A G A G C A T C C C G C
C G C T C A T C A A A A A G T A C T G A

1 Y F P P P A A K E D F L G C L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P S V L G Q T I
Y F P P P A A K E D F L G X L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P

41 R N S R W S S P D N V K P I Y I V T P T N A S H I Q S A V V C G R R H G V R I R

81 V R S G G H D Y E G L S Y R S L Q P E E F A V V D L S K M R A V W V D G K A R T
G L K Y R X L K P E

121 A W V D S G A Q L G E L Y Y A I H K A S T V L A F P A G V C P T I G V G G N F A

161 G G G F G M L L R K Y G I A A E N V I D V K L V D A N G T L H D K K S M G D D H
K X M G D D H

201 F W A V R G G G E S F G I V V A W K V R L L P V P P T V T V F K I P K K A S E
F X A V R A P E

241 G A V D I I N R W Q V V A P Q L P D D L M I R V I A Q G P T A T F E A M Y L G T
G A V D I I

281 C Q T L T P M M S S K F P E L G M N A S H C N E M S W I Q S I P F V H L G H R D

321 N I E D D L L N R N N T F K P F A E Y K S D Y V Y E P P P K R V W E Q I F S T W

361 L L K P G A G I M I F D P Y G A T I S A T P E W A T P F P H R R G V L F N I Q Y
S A T P F X H R R G V L F N I Q Y

401 VNYWFAPGAGAAPLSWSKEIYNYMEPYVSKNPRQAYANYR
MEPYVVSINPVQAYANY

441 D I D L G R N E V V N D V S T F S S G L V W G Q K Y F K G N F Q R L A I T K G K

481 V D P T D Y F R N E Q S I P P L I K K Y .

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.